

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003年9月12日 (12.09.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/074099 A1

- (51) 国際特許分類: A61L 27/18, 都市 三谷北通 6 丁目 2 0 9 番地の 1 株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング内 Aichi (JP).
27/52, C12M 3/00, C12N 5/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/02531 (74) 代理人: 特許業務法人アイテック国際特許事務所 (ITEC INTERNATIONAL PATENT FIRM); 〒460-0008 愛知県名古屋市中区栄二丁目 9 番 2 6 号 ポーラ名古屋ビル Aichi (JP).
- (22) 国際出願日: 2003 年 3 月 5 日 (05.03.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願 2002-60698 2002 年 3 月 6 日 (06.03.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング (JAPAN TISSUE ENGINEERING CO., LTD) [JP/JP]; 〒443-0022 愛知県蒲郡市三谷北通 6 丁目 2 0 9 番地の 1 Aichi (JP).
- (71) 出願人 および
- (72) 発明者: 由井 伸彦 (YUI, Nobuhiko) [JP/JP]; 〒923-1225 石川県能美郡辰口町松が岡 4-1 0 3 Ishikawa (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 加藤 雅一 (KATO, Masakazu) [JP/JP]; 〒443-0022 愛知県蒲郡市三谷北通 6 丁目 2 0 9 番地の 1 株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング内 Aichi (JP). 福島 里佳 (FUKUSHIMA, Rika) [JP/JP]; 〒443-0022 愛知県蒲
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: BASE MATERIAL FOR TISSUE REGENERATION, TRANSPLANTATION MATERIAL AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME

(54) 発明の名称: 組織再生用基材、移植用材料及びその製法

(57) Abstract: A base material for tissue regeneration which is made of polyrotaxane wherein biocompatible groups having a bulky substituent are introduced, via hydrolyzable bonds, into both ends of a linear molecule penetrating through plural cyclic molecules or a polyrotaxane hydrogel having a network structure wherein a polyrotaxane molecule is bonded to the adjacent polyrotaxane molecule via crosslinkage of cyclic molecules with each other, crosslinkage of biocompatible molecules with each other or crosslinkage of a cyclic molecule with a biocompatible group, characterized in that the above-described cyclic molecules have a modifying group such as an amino group imparting cell adhesiveness (for example, an aminated hydrogel). By culturing, for example, cartilage cells with the use of this base material for tissue regeneration, the cells proliferate while holding the cartilage cell-like morphology. In particular, cells can be well sustained compared with the case where no modifying group such as an amino group is present.

(57) 要約: 本発明の組織再生用基材は、複数の環状分子を貫通させた線状分子の両末端に加水分解性結合を介して嵩高い置換基を有する生体親和性基が導入されたポリロタキサン、又は、このポリロタキサンにつき隣合うポリロタキサン 1 分子中に含まれる環状分子同士、生体親和性基同士もしくは環状分子と生体親和性基とを架橋結合で架橋して網目構造としたポリロタキサンヒドロゲルからなる組織再生用基材において、前記環状分子が細胞接着性を付与するアミノ基のような修飾基を有するものである (例えばアミノ化ヒドロゲル)。この組織再生用基材を用いて例えば軟骨細胞を培養すると、細胞は軟骨細胞様の形態を維持しながら増殖する。特に、アミノ基のような修飾基がない場合に比べて細胞を効率よく保持することができる。

WO 03/074099 A1

明細書

組織再生用基材、移植用材料及びその製法

5 技術分野

本発明は、整形外科、口腔外科、形成外科などの医療分野に広く利用可能な組織再生用基材、移植用材料及びその製法に関する。

背景技術

- 10 近年、再生医療や組織工学が注目されている。組織工学では、細胞増殖の足場として組織再生用基材が重要な役割を担っている。組織再生用基材に求められる機能としては、生体親和性、分解性、力学的強度などがある。

- 従来、このような組織再生用基材として、コラーゲンやポリグリコール酸などが知られているが、動物由来のマトリクスでは未知のウイルスなどの感染性が否定できないこと、一方、人工物であっても分解産物が炎症反応を誘起する可能性があること、更に、分解・消失の時間制御が困難であることなどが未だ解決されていない。

- これらの問題を解決するために、本発明者らはWO 02/02159
20 (国際公開公報)において、複数の環状分子を貫通させた線状分子の両末端に加水分解性結合を介して嵩高い置換基を有する生体親和性基が導入されたポリロタキサン、又は、このポリロタキサンにつき隣接するポリロタキサン1分子中に含まれる環状分子同士、生体親和性基同士もしくは環状分子と生体親和性基とを架橋結合で架橋して網目構造としたポリロタキサンヒドロゲルからなる組織再生用基材を提案している。

しかしながら、前出の公報で提案した組織再生用基材では、細胞接着

性が十分でないことがあり、細胞播種において効率よく組織再生用基材に細胞を保持させることが難しいことがあった。

本発明は上記問題点を解決することを課題とするものであり、細胞接着性を向上させた組織再生用基材を提供することを目的の一つとする。

- 5 また、良好に組織を再建できる移植用材料を提供することを目的の一つとする。更に、そのような移植用材料の製法を提供することを目的の一つとする。

発明の開示

- 10 本発明の第1は、複数の環状分子を貫通させた線状分子の両末端に加水分解性結合を介して嵩高い置換基を有する生体親和性基が導入されたポリロタキサン、又は、このポリロタキサンにつき隣合うポリロタキサン1分子中に含まれる環状分子同士、生体親和性基同士もしくは環状分子と生体親和性基とを架橋結合で架橋して網目構造としたポリロタキサ
15 ンヒドロゲルからなる組織再生用基材において、前記複数の環状分子には細胞接着性を付与する修飾基を有するものがあることを特徴とする。

- この組織再生用基材を用いて例えば軟骨細胞を培養すると、細胞は軟骨細胞様の形態を維持しながら増殖する。また、この組織再生用基材を単体で生体内に移植しても細胞形態や増殖を阻害することがほとんどないため組織再生が可能である。特に、環状分子が細胞接着性を付与する修飾基を有しているため、このような修飾基がない場合に比べて細胞を
20 効率よく保持することができる。

- 本発明の組織再生用基材において、線状分子や環状分子は生体親和性（生体にほとんど害を与えない性質）を有するものであれば特に限定されないが、線状分子としては、ポリエチレングリコール、ポリプロピレ
25 ングリコール、ポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールと

の共重合体、及びポリメチルビニルエーテルからなる群より選ばれる一種又は二種以上であることが好ましい。このように構成する環状分子や線状分子として、生体親和性に優れているものを選ぶことにより、合成されたポリロタキサンやポリロタキサンヒドロゲルは生体親和性に優れ、

5 組織再生用移植材料として適している。また、平均分子量は200～100000、特に400～5000であることが好ましい。環状分子としては、 α 、 β 又は γ -シクロデキストリンであることが好ましいが、これと類似の環状構造を持つものであってもよく、そのような環状構造としては環状ポリエーテル、環状ポリエステル、環状ポリエーテルアミン、環状ポリアミン等が挙げられる。線状分子と環状分子の組み合わせ

10 としては、 α -シクロデキストリンとポリエチレングリコールとの組合せが好ましい。

本発明の組織再生用基材において、加水分解性結合としては、生体内で加水分解する結合であればどのような結合であってもよい。このうち、

15 生体内で速やかに非酵素的に加水分解することを考慮すればエステル結合であることが好ましい。

組織再生用基材がポリロタキサンヒドロゲルの場合、架橋結合はウレタン結合、アミド結合、カルバミド結合、エーテル結合、スルフィド結合又はシッフ塩基型結合が好ましい。また、架橋結合は、環状分子同士

20 を架橋する場合、加水分解性結合よりも水に対して安定であることが好ましい。これは、先に加水分解性結合が分解して線状分子の両末端から嵩高い置換基を有する生体親和性基が外れ、架橋結合された環状分子が一度期に脱離することにより、良好な分解パターンが得られるからである。

25 本発明の組織再生用基材において、線状分子の両末端の生体親和性基としては、生体に対する親和性が高い基（生体に対して安全性の高い基）

- であればどのような基であってもよいが、例えばアミノ酸、オリゴペプチド、オリゴ糖類又は糖誘導体であることが好ましい。アミノ酸としては、例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、アスパラギン酸、グルタミンサン、グリシン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、リジン、アルギニン、ヒスチジン等が挙げられる。また、オリゴペプチドとしては、前出のアミノ酸の複数がペプチド結合して形成されたもの等が挙げられる。また、オリゴ糖類としては、繰り返し単位が1～5であり、構成多糖としてデキストラン、ヒアルロン酸、キチン、キトサン、アルギン酸、コンドロイチン硫酸、でんぷんからなるもの等が挙げられる。更に、糖誘導体としては、オリゴ糖類、多糖又は単糖をアセチル化やイソプロピル化等の化学修飾した化合物等が挙げられる。このうち、ベンゼン環を有するアミノ酸、例えばL-フェニルアラニン、L-チロシン、L-トリプトファン等が好ましい。
- 15 本発明の組織再生用基材において、生体親和性基の嵩高い置換基としては、線状分子から環状分子が抜け落ちるのを防止できればどのような基であってもよいが、例えば1以上のベンゼン環を有する基又は1以上の第三ブチルを有する基が好ましい。1以上のベンゼン環を有する基としては、例えばベンジルオキシカルボニル(Z)基、9-フレオレニル
- 20 メチルオキシカルボニル(Fmoc)基、ベンジルエステル(OBz)基等が挙げられ、また、1以上の第三ブチルを有する基としては、第三ブチルカルボニル(Boc)基、アミノ酸第三ブチルエステル(OBu基)等が挙げられるが、このうち、ベンジルオキシカルボニル基が好ましい。
- 25 本発明の組織再生用基材としては、上記線状分子がポリエチレングリコール、上記環状分子が α -シクロデキストリン、上記加水分解性結合

がエステル結合、上記嵩高い置換基を有する生体内分解性基がベンジルオキシカルボニル-L-フェニルアラニンであることが特に好ましい。

なお、 α -シクロデキストリンをポリエチレングリコールに貫通させる場合、 α -シクロデキストリンとポリエチレングリコールの繰り返し単位

5 位（エチレンオキシド単位）の比の化学量論数は1：2といわれている。

本発明の組織再生用基材において、前記修飾基は、正に荷電する基であることが好ましい。一般に、細胞はプラス及びマイナスの両電荷を有しているもののマイナスの電荷が多いことが知られており全体的には負電荷を有していることから、修飾基として正に荷電して正電荷を持つ基
10 を導入すれば細胞接着性が向上し、細胞を効率よく保持することができるため好ましい。

本発明の組織再生用基材において、前記修飾基は、窒素原子を含む基であることが好ましい。窒素原子は正に荷電してカチオン化する性質を有していることから、負電荷を有している細胞との接着性が向上し、細胞
15 を効率よく保持することができるため好ましい。窒素原子を含む基としては、例えば以下のアミノ化剤によって環状分子に導入されるアミノ基が挙げられる。即ち、ヒドラジン、1, 2-ジアミノエタン（エチレンジアミン）、1, 3-ジアミノプロパン、1, 4-ジアミノブタン、1, 5-ジアミノプロパン、1, 6-ジアミノヘキサンなどのジアミン
20 アルカン類、o-フェニレンジアミン、m-フェニレンジアミン、p-フェニレンジアミンなどのジアミノベンゼン類、ポリリジン、ポリピニルアミン、キトサンなどのポリアミン類（複数のアミノ基を有する高分子化合物）などが挙げられる。

前記修飾基がアミノ基の場合において、ポリロタキサンヒドロゲルへ
25 のアミノ基の導入割合と、組織再生用基材を用いて所定の細胞を培養したときの細胞増殖状態又はグリコサミノグリカン産生状態との相関関係

を予め求めておき、該相関関係に照らして所望の細胞増殖状態又はグリコサミノグリカン産生状態となるようにアミノ基の導入割合を設定してもよい。例えば、採取細胞の量が多いときには細胞増殖能は低くてもグリコサミノグリカンの産生能が高いアミノ基の導入割合を採用し、採取
5 細胞の量が少ないときにはグリコサミノグリカンの産生能が低くても細胞増殖能が高いアミノ基の導入割合を採用してもよい。

その他に、前記修飾基は、ポリカチオンであってもよい。この場合も、負電荷を有している細胞との接着性が向上し、細胞を効率よく保持することができるため好ましい。ポリカチオンは正電荷を多数有する高分子
10 化合物であり、例えば四級アンモニウムを含む高分子化合物などが挙げられる。

本発明の組織再生用基材において、前記修飾基は、疎水性の基であることが好ましい。一般に、修飾基として疎水性基を導入すれば細胞接着性が向上し、細胞を効率よく保持することができるため好ましい。

15 本発明の組織再生用基材において、前記修飾基は、アシル基、コレステロール、トリグリセリド、リン脂質、グリセロ糖脂質及びスフィンゴ糖脂質からなる群より選ばれた1種又は2種以上であることが好ましい。これらの基は水酸基を保護することにより疎水性になることから細胞接着性が向上し、細胞を効率よく保持することができるため好ましい。こ
20 のうちアシル基としては、例えば以下のアシル化剤によって環状分子に導入される基が挙げられる。即ち、無水酢酸、無水プロパン酸、無水ブタン酸、無水安息香酸などの酸無水物、酢酸クロリドなどの酸ハライドなどが挙げられるが、このうち酸無水物が好ましい。

本発明の組織再生用基材は、複数のシクロデキストリンを貫通させた
25 線状分子の両末端に加水分解性結合を介して嵩高い置換基を有する生体親和性基が導入されたポリロタキサンとN, N'-カルボニルジイミダ

ゾールとを反応させて得られた反応生成物に、ポリエチレングリコールビスアミンおよびアミノ化剤を反応させることにより得られたものであってもよい。このようにして得られた化合物はポリロタキサンヒドロゲルがアミノ化されたものであるため、ヒドロゲル内に正電荷が導入されて細胞接着性が向上する。なお、線状分子、加水分解性結合、嵩高い置換基及び生体親和性基としては、前述したものを採用してもよい。

本発明の組織再生用基材は、複数のシクロデキストリンを貫通させた線状分子の両末端に加水分解性結合を介して嵩高い置換基を有する生体親和性基が導入されたポリロタキサンとN, N'-カルボニルジイミダゾールとを反応させて得られた反応生成物に、ポリエチレングリコールビスアミンおよびアシル化剤を反応させることにより得られたものであってもよい。このようにして得られた化合物はポリロタキサンヒドロゲルがアシル化されたものが得られるため、疎水性が増して細胞接着性が向上する。なお、線状分子、加水分解性結合、嵩高い置換基及び生体親和性基としては、前述したものを採用してもよい。

本発明の組織再生用基材は、細胞を培養又は組み込み可能な形態であれば特にどのような形態であろうと限定されない。例えばシート状にしてその上に細胞を播種したり、細胞とともにゲル状にして細胞を包埋したり、ゲル状にしてその上に細胞を播種したり、溶媒に溶かしてその溶液に細胞を播種したり、溶媒に懸濁させてその懸濁液に細胞を播種したりしてもよい。特に、細胞を保持・培養しやすくする点を考慮すれば、ポリロタキサン又はポリロタキサンヒドロゲルの多孔体を用いることが好ましい。このときの孔については細胞を保持できる大きさ・密度であれば特に限定されない。また、細胞と組み合わせず組織再生用基材を単体で生体内に移植する場合にも、組織再生用基材の形態が限定されることはない。好ましくは移植周辺組織からの細胞が増殖するのに好適な環

境を与えるため、多孔体にすることが好ましい。その際、孔の大きさ、密度は移植周辺組織から細胞が侵入し、細胞増殖や基質産生等の組織再生するのに適当な大きさ、密度とすればよく、特に限定はされない。また、多孔体の製法としては、周知の方法を適用可能であり、例えば、炭酸水素ナトリウム存在下でゲル化する方法や、含水ヒドロゲルを真空凍結乾燥する方法等が適用可能である。

本発明の組織再生用基材は特にどのような細胞の培養又は組み込みに用いてもよいが、例えば、接着依存性細胞であることが好ましく、例えば、軟骨細胞、骨芽細胞、線維芽細胞、表皮細胞、上皮細胞、脂肪細胞、肝細胞、脾細胞、筋細胞又はこれらの前駆細胞や、間葉系幹細胞、胚性幹細胞（ES細胞）等が挙げられる。これらの細胞は移植対象部位に応じて単独で用いてもよいし2種以上を用いてもよい。これらの細胞は、細胞種に応じた公知の採取方法によって生体から採取すればよく、また、採取された細胞をそのまま使用してもよいし、適当な培地で所定期間培養することで増殖または分化させたあとに組織再生用基材に播種してもよい。

本発明の組織再生用基材を用いて組織を再生する方法としては、組織再生用基材を単体で使用方法や、この組織再生用基材に単に細胞を組み込み使用方法や、この組織再生用基材で細胞を培養して使用方法などが挙げられる。また、細胞を固定化する方法としては、例えば、ポリロタキサンヒドロゲルにあっては高濃度の細胞培養液を添加しゲルの膨潤と共に細胞をゲル孔内へ取り込ませることにより固定化する方法、回転培養する方法、細胞を播種したあと細胞に影響を与えない程度に減圧することにより固定化する方法などが挙げられる。

本発明の組織再生用基材に細胞が培養されているか又は細胞が組み込まれた移植用材料を用いれば、組織再生用基材を単体で使用するよりも

早期に組織再生が可能となる。この移植用材料を製造する方法としては、特にどのような製造方法でもよいが、前記組織再生用基材を使用目的に応じて適当な大きさ又は形状にしたあと、この組織再生用基材に細胞を培養するか組み込むことにより移植用材料を得ることが好ましい。例えば、
5 耳の軟骨の再建に用いる場合には、耳の適用部位に適合するよう整形・加工した組織再生用基材に細胞懸濁液を注入して、一定期間培養して移植用材料としてもよい。この場合、この移植用材料は耳の適用部位に埋め込まれる。逆に、組織再生用基材に細胞を培養又は組み込んだあと、この移植用材料を利用時又は出荷時に適用部位に応じた適切な大きさ又は形状にしてもよい。
10

本発明の組織再生用基材に例えば軟骨細胞が培養された移植用材料では、培養細胞は軟骨細胞様の形態を維持しながら増殖し、軟骨基質を豊富に産生している。軟骨組織は、軟骨細胞とその細胞が産生する基質によって主に修復されるため、予めこれらが豊富に含有されていることは、
15 その移植用材料が高い組織再生能力を有することを意味している。このように、培養操作を行った場合には、組織修復に必要な細胞を増殖させること、あるいは、細胞の産生物質（基質や成長因子など）を移植用材料中に担持できる点で好ましいが、何らかの理由によって細胞が死滅した場合でも、細胞が産生した基質や成長因子は移植用材料中に残存するため組織再生には有効である。さらに、前記組織再生用基材に例えば軟
20 骨細胞を播種しただけ、即ち、培養せずに単に組み込んだだけでも、細胞の形態が維持されるために移植直後からこれらの細胞が組織再生に機能し、移植用材料として有効である。

25 図面の簡単な説明

図 1 はポリロタキサンの合成手順を表す説明図、図 2 は C D I - P R

の合成手順を表す説明図、図3はアミノ化ヒドロゲルの合成手順を表す説明図、図4はアセチル化ヒドロゲルの合成手順を表す説明図、図5はポリリジン固定化ヒドロゲルの合成手順を表す説明図、図6は細胞接着性の評価を表すグラフ、図7は細胞増殖性の評価を表すグラフ、図8は
5 アミノ基量と細胞増殖能との関係を表すグラフ、図9はアミノ基量とグリコサミノグリカンの産生能との関係を表すグラフ、図10はアミノ基量と1細胞あたりのグリコサミノグリカンの産生量との関係を表すグラフである。

10 発明を実施するための最良の形態

〔実施例1〕 ポリロタキサンの合成（図1参照）

〔1-1〕 両末端にアミノ基を有するPEGの合成

分子量3300のポリエチレングリコール（PEG）（33g，10
mmol）と無水コハク酸（20g，200mmol）をトルエン（2
15 20ml）に溶解させ、この溶液を150℃で5時間還流させた。反応
終了後、過剰のジエチルエーテルに注ぎ込み、濾別・減圧乾燥して粗生
成物を得た。これをジクロロメタンに溶解させ、不溶物を遠心分離によ
り除去し、過剰のジエチルエーテルに注ぎ込んで、濾別・減圧乾燥後に
20 両末端にカルボキシル基を有するPEG（化合物A）を白色粉末として
得た。この化合物A（20g，5.7mmol）とN-ヒドロキシスク
シンイミド（HOSu）（17.1g，148.2mmol）を1，4
-ジオキサンとジクロロメタンの混合溶液（350ml，体積比1：1）
に溶解させ、氷冷後ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）（23.
5g，114mmol）を加えた。氷冷したまま1時間攪拌し、その後
25 室温で終夜攪拌した。副生成物のジシクロヘキシルウレアを濾別し、濾
液は濃縮してから過剰のジエチルエーテルに注ぎ込んだ。濾別・減圧乾

乾燥後にカルボキシル基が活性化されたPEG（化合物B）を白色粉末として得た。次いで、エチレンジアミン（0.4 ml, 6 mmol）を溶解させたジクロロメタン（75 ml）に、化合物B（10 g, 2.7 mmol）を溶解させたジクロロメタン（75 ml）を滴下し、滴下終了後から室温で1時間攪拌した。反応終了後、溶液を過剰のジエチルエーテルに注ぎ込み、濾別・減圧乾燥後に両末端にアミノ基を有するPEG（化合物C）を白色粉末として得た。

[1-2] 擬ポリロタキサンの調製

α -シクロデキストリン（ α -CD）（48 g, 49.2 mmol）の飽和水溶液（311 ml）に化合物C（4 g, 1.12 mmol）の水溶液（20 ml）を室温で滴下した。1時間超音波を照射しながら攪拌し、その後室温で24時間攪拌した。遠心分離により白色の沈殿物を回収し、50℃で減圧乾燥を行い、白色粉末の擬ポリロタキサンを得た。なお、ポリロタキサンとは、多数の環状分子（例えばシクロデキストリン）に線状分子（例えばPEG）が貫通し、その線状分子の両末端を嵩高い置換基でキャップしたものをいい、擬ポリロタキサンとは、ポリロタキサンの両末端を未だ嵩高い置換基でキャップしていないものをいう。

[1-3] 末端キャップ剤の調製

α -CDの脱離を防止する嵩高い置換基としてベンジルオキシカルボニル-L-フェニルアラニン（Z-L-Phe、Zはベンジルオキシカルボニル基を表す）を導入するために、Z-L-Pheのカルボキシル基の活性化を行った。すなわち、Z-L-Phe（100 g, 334 mmol）を1,4-ジオキサン（800 ml）に溶解させ、氷冷しながらHOSu（38.42 g, 334 mmol）を加えた。1時間後にDCC（75.7 g, 367 mmol）を溶解させた1,4-ジオキサン溶液（200 ml）をゆっくり加え、氷冷したまま1時間攪拌し、その

後室温で終夜攪拌した。副生成物のジシクロヘキシルウレアを濾別し、濾液は濃縮してから過剰のジエチルエーテルに注ぎ込み、濾別・減圧乾燥後に粗生成物を得た。室温でできるだけ飽和濃度になるように粗生成物をジクロロメタンに溶解させた後、石油エーテルを適量加え冷蔵し、

- 5 再結晶を行った。結晶を濾別・減圧乾燥して白色針状結晶の Z-L-Phe のスクシンイミドエステル (Z-L-Phe-OSu) を得た。

[1-4] ポリロタキサンの調製

- Z-L-Phe-OSu (80 g, 200 mmol) をジメチルスルフォキシド (DMSO) (60 ml) に溶解させ、擬ポリロタキサン (4
10 5 g, 2 mmol) を加えた。この不均一溶液を室温で攪拌しながら、均一になるように少しずつ DMSO を加えて 96 時間攪拌した。反応終了後、反応溶液を過剰のジエチルエーテルに注ぎ込み、粗生成物を得た。粗生成物をアセトン、ジメチルホルムアミド (DMF) の順で洗浄して不純物 (未反応 Z-L-Phe-OSu、 α -CD、化合物 C など) を
15 除去し、濾別・減圧乾燥して生分解性のポリロタキサンを白色粉末として得た。合成の確認は、 $^1\text{H-NMR}$ により行った。また、このポリロタキサンの α -CD 貫通数を $^1\text{H-NMR}$ での PEG のプロトンと α -CD の 1 位のプロトンとの積分比から求めたところ、2.3 であった。

[実施例 2] CDI 活性化ポリロタキサンの調製 (図 2 参照)

- 20 実施例 1 で得られたポリロタキサン (1 g, 0.0369 mmol, CD=0.871 mmol, OH=15.6 mmol) を DMSO (10 ml) に窒素雰囲気下で溶解させ、N,N'-カルボニルジイミダゾール (CDI) 2.54 g (15.6 mmol; ポリロタキサン中の水酸基と等量) を加え、窒素雰囲気下室温で反応を行い、3 時間経過後エー
25 テルに滴下して白色沈殿物を生成させ、これをろ過し室温で減圧乾燥して白色粉末の CDI 活性化ポリロタキサン (CDI-PR) を得た。こ

のCDI-PRの活性化率を紫外吸光分光計を用いて207nmの吸光度から算出したところ、91.37%であった。

〔実施例3〕アミノ化ヒドロゲルの調製（図3参照）

実施例2で得られたCDI-PR 2.347g（ポリロタキサンとして1g）をDMSO 5mlに溶解させ、そこへ融解した両末端にアミノ基を有するポリエチレングリコール（PEG-BA，平均分子量2000）1.7426gを加えて攪拌した。さらに炭酸水素ナトリウム30gを加え、よく攪拌した後に、ポリテトラフルオロエチレン製のスペーサ（直径1.3cm，深さ1cm）に0.8gずつ入れて、35℃で10日ゲル化反応を行い、ポリロタキサンヒドロゲルとした。反応終了後、エチレンジアミン5mlをDMSO 500mlに溶解した溶液にこのポリロタキサンヒドロゲルを加えて、25℃で12時間アミノ化反応を行った。ここで、ゲル化反応において未反応の活性化部位に対してエチレンジアミンが付加することでアミノ化されると考えられる。アミノ化反応終了後、反応生成物を20重量%のクエン酸水溶液に浸漬して、炭酸水素ナトリウムの発泡および溶出を9時間行うことにより多孔質化を行った。発泡・溶出終了後に得られた反応生成物を蒸留水で洗浄し、エタノールで脱水和を行い、最後に凍結乾燥してアミノ化ヒドロゲルを得た。このアミノ化ヒドロゲルの推定構造を図3に示す。

20 〔実施例4〕アセチル化ヒドロゲルの調製（図4参照）

実施例2で得られたCDI-PR 2.347g（ポリロタキサンとして1g）をDMSO 5mlに溶解させ、そこへ融解した両末端にアミノ基を有するポリエチレングリコール（PEG-BA，平均分子量2000）1.7426gを加えて攪拌した。さらに炭酸水素ナトリウム30gを加え、よく攪拌した後に、ポリテトラフルオロエチレン製のスペーサ（直径1.3cm，深さ1cm）に0.8gずつ入れて、35℃で1

日ゲル化反応を行い、ポリロタキサンヒドロゲルとした。反応終了後、無水酢酸 25 ml とピリジン 37.5 ml を DMSO 500 ml に溶解した溶液にこのポリロタキサンヒドロゲルを加えて、25℃で12時間アセチル化反応を行った。ここで、ゲル化反応において未反応の活性化部位と未活性の水酸基に対してアセチル基が導入されると考えられる。アセチル化反応終了後、反応生成物を20重量%のクエン酸水溶液に浸漬して、炭酸水素ナトリウムの発泡および溶出を9時間行うことにより多孔質化を行った。発泡・溶出終了後に得られた反応生成物を蒸留水で洗浄し、エタノールで脱水和を行い、最後に凍結乾燥してアセチル化ヒドロゲルを得た。このアセチル化ヒドロゲルの推定構造を図4に示す。

〔実施例5〕ポリリジン固定化ヒドロゲルの調製（図5参照）

ポリε-リジンは、有機溶媒に溶解しないためα-CDと反応させて擬ポリロタキサン型ポリリジンとしたあと反応系に添加した。即ち、予めポリε-リジンとα-CDとを反応させて擬ポリロタキサン型ポリリジンとし、これをアミノ化剤とした。この擬ポリロタキサン型ポリリジン 1.7833 g (0.0738 mmol; ポリロタキサンの2等量) と実施例2で得られたCDI-PR 2.347 g (ポリロタキサンとして1 g) をDMSO 5 ml に溶解させ、そこへ融解した両末端にアミノ基を有するポリエチレングリコール (PEG-BA, 平均分子量 2000) 1.7426 g を加えて攪拌した。さらに炭酸水素ナトリウム 30 g を加え、よく攪拌した後に、ポリテトラフルオロエチレン製のスパーサ (直径 1.3 cm, 深さ 1 cm) に 0.8 g ずつ入れて、35℃で1日ゲル化反応を行った。DMSO 中では擬ポリロタキサン型ポリリジンの解離が生起するため、ポリε-リジンのアミノ基が露出されて CDI-PR との反応が進行しゲル内に固定化される。ゲル化反応終了後に、反応生成物を20重量%のクエン酸水溶液に浸漬して、炭酸水素ナトリ

ウムの発泡および溶出を9時間行うことにより多孔質化を行った。発泡・溶出終了後に反応生成物を蒸留水で洗浄し、エタノールで脱水和を行い、最後に凍結乾燥してポリεーリジン固定化ヒドロゲルを得た。このポリεーリジン固定化ヒドロゲルの推定構造を図5に示す。

5 [実施例6] 接着効率の測定

実施例3で得たアミノ化ヒドロゲルと、実施例3においてアミノ化反応を省略して得たヒドロゲル（以下、非修飾ヒドロゲルという）とを用いて細胞培養実験を行った。即ち、アミノ化ヒドロゲルおよび非修飾ヒドロゲルの各々を12分割し、十分に水洗後、70%エタノールに30
10 分間浸漬して滅菌した。その後、培養用シャーレに移し、滅菌缶の中で蓋を開封した状態にして50℃で一晩乾燥した。分割した各ヒドロゲルに 1×10^7 cells/mLに調整したウサギ軟骨細胞懸濁液を20
μL滴下した。この状態で30分間放置した後、24穴プレートに移し、培養用培地2mLを加えた。また、検量線作成のために、 6.4×10^6
15 cells/mLの細胞懸濁液を調整し、24穴プレートに $6.4 \times 10^5 \sim 1 \times 10^4$ cells/100mL/ウェルとなるように調整した。

接着効率の測定は、各ヒドロゲルから零れ落ちた細胞数をMTTアッセイで計測することにより行った。MTTアッセイでは、MTT試薬が細胞内酵素活性によって還元されてフォルマザンが生成されることから
20 フォルマザンは生細胞数の酵素活性に相関しているため、フォルマザンの吸光度を測定することにより細胞数を計測することができる。まず、播種24時間後の培養していた各ヒドロゲル入りの24穴プレートを、37℃に設定したマイクロプレートミキサで2時間攪拌した。この操作により接着せずに溜まっている細胞をヒドロゲルより洗い出した。その
25 後、ヒドロゲルを別の24穴プレートに移し、培養用培地2mLを各穴に加えて軟骨細胞培養実験に供した。

一方、零れ落ちた（洗い出した）細胞が存在する24穴プレートには、MTT試薬50 μ Lを各穴に滴下し、マイクロインキュベータで24時間攪拌しながら培養した。培養後、MTTが細胞内脱水素酵素により還元されて生成するフォルマザンを0.04 mol/LのHCl/イソプロパノール1000 μ Lで可溶化して、溶液200 μ Lを96穴プレートに移して吸光度（A570/650）を測定し、接着効率の測定を行った。検量線用プレートも同様の操作で処理した。その結果、図6に示すように、アミノ化ヒドロゲルで培養したものは検出限界以下であったのに対し、非修飾ヒドロゲルで培養したものは播種細胞数に対し42.6%が非修飾ヒドロゲルに取り込まれずに零れ落ちた結果となった。なお、MTTは3-（4,5-ジメチル-2-チアゾイル）-2,5-ジフェニル-2H-テトラゾリウムブロマイドの略である。

〔実施例7〕細胞増殖性の評価

軟骨細胞培養実験に供した24穴プレートでは、37℃、5%CO₂インキュベータ内で21日間静置培養を行った。培養中は、経時的に顕微鏡観察を行い、MTTアッセイによる細胞数の計測を行った。その結果、アミノ化ヒドロゲルで培養したものと非修飾ヒドロゲルで培養したものとはほぼ同様の増殖曲線が得られた。ただし、培養21日後以降は、アミノ化ヒドロゲルで培養したものの方が非修飾ヒドロゲルで培養したものに比べ生細胞数が多くなり、培養28日後には非修飾ヒドロゲル中の生細胞数は 1.8×10^6 cells/担体（n=3）であったのに対し、アミノ化ヒドロゲル中の生細胞数は 2.7×10^6 cells/担体（n=1）と、ほぼ1.5倍の細胞数となった。

また、アミノ化ヒドロゲルで培養したものと非修飾ヒドロゲルで培養したものの培養28日後のアルシアンブルーによる染色像を撮影したところ、いずれも強度のアルシアンブルー陽性像が得られ、軟骨基質（酸

性ムコ多糖（グリコサミノグリカン）類）が産生していることが確認できた。ただし、アミノ化ヒドロゲルで培養したものでは、アルシアンブルー陽性部位が担体全体に連続していたのに対し、非修飾ヒドロゲルで培養したものでは、細胞コロニーが散在しそのコロニー周囲にアルシアンブルー陽性部位が限定されており、両者は明確に差別化することができた。

〔実施例 8〕 アミノ基量と細胞増殖能との相関及びアミノ基量とグリコサミノグリカン産生能との相関

エチレンジアミンによりアミノ基を導入したアミノ化ヒドロゲルとして、実施例 3 に準じて下記表に示すコード番号 Amino-2~7 を作製した。ここで、Amino-1 はコントロールであり、エチレンジアミンによるアミノ基の導入を行っていないポリロタキサンヒドロゲルである。下記表中、アミノ基量とは、ドライゲル 1 g に対するアミノ基の μmol 数を表す数値である。表中の Amino-1 では、アミノ基を導入していないにもかかわらずアミノ基量が $12\ \mu\text{mol/g}$ 程度となっているが、これはアミノ化前のポリロタキサンヒドロゲル中に含まれる NH によるものと思われる。このため、Amino-2~7 のアミノ基の導入割合は、各アミノ基量から Amino-1 のアミノ基量を差し引いた値と推定される。

コード	置換基	アミノ基量 ($\mu\text{mol/g Dried gel}$)
Amino-1 (control)	なし	12.02
Amino-2	アミノ基	35.72
Amino-3	アミノ基	65.01
Amino-4	アミノ基	70.96
Amino-5	アミノ基	75.33
Amino-6	アミノ基	80.79
Amino-7	アミノ基	88.23

各コードのポリロタキサンヒドロゲルを用いた細胞培養は以下のようにして行った。即ち、各コードのポリロタキサンヒドロゲルを4分割し、十分に水洗後（蒸留水中での攪拌（30分間）を4度行った）、70%エタノールに30分間浸漬して滅菌した。その後、24穴プレートに移し、安全キャビネット内で一晚送風乾燥した。このポリロタキサンヒドロゲルに $1 \times 10^7 \text{ cells/mL}$ に調整したウサギ軟骨細胞液を200 μL 滴下した。30分間放置した後、培養用培地を加えた。また、検量線作成のために、 $6.4 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ の細胞懸濁液を調整し、24穴プレートに $6.4 \times 10^5 \sim 1 \times 10^4 \text{ cells}/1000 \mu\text{L/well}$ の範囲で播種した。37℃、5%CO₂インキュベータ内で24日間静置培養を行った。培地交換は3～4日ごとに行った。

生細胞数の測定は以下のようにして行った。即ち、24穴プレートから各コードのポリロタキサンヒドロゲルにつきそれぞれ4つずつ取り出し、新たな24穴プレートに入れて10%FBS/PBS 1mLとMTT溶液100 μL を添加し、マイクロインキュベータで24時間攪拌しながら培養した。0.04mol/L HCl/イソプロパノール1mLを加えて攪拌しながら生成フォルマザンを可溶化させた。96穴プレ

ートに $200\ \mu\text{L}$ ずつ入れて吸光度 ($A_{570/650}$) を測定し、測定した吸光度を別途作成した検量線に照らして生細胞数を求めた。

- グリコサミノグリカン (GAG) の定量は以下のようにして行った。
- 即ち、24穴プレートから各コードのポリロタキサンヒドロゲルにつき
- 5 それぞれ4つずつ取り出し、48穴プレートにPBS $0.5\ \text{mL}$ と共に入れた。2時間マイクロインキュベータで攪拌しながら洗浄した。この洗浄操作をもう一度繰り返した後、一昼夜 4°C で保管した。PBSを吸引後、細胞分散液 $0.5\ \text{mL}$ を添加し、マイクロインキュベータで3時間攪拌しながらインキュベーションし、細胞基質を分解した。測定には、
- 10 簡易型・酸性ムコ多糖定量キット (ホクドー社製) を用いた。まず、未知検体 $100\ \mu\text{L}$ をマイクロ遠心チューブに入れ、用事調製 (緩衝液 $53.6\ \text{mL}$ に対して発色原液 $1.7\ \text{mL}$ を加えて攪拌) した反応溶液 $1.3\ \text{mL}$ を添加し攪拌した。5~20分後の反応液 $200\ \mu\text{L}$ を96穴プレートに移して直ちに吸光度 ($650\ \text{nm}$) を測定し、測定した吸光度
- 15 を別途作成した検量線に照らしてGAGの産生量を求めた。なお、検量線を作成する際には、標準溶液を $100, 40, 20, 10, 5, 2, 5, 1, 25\ \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度に調製し、未知検体と同様に操作した。

- これらの結果を図8及び図9に示す。図8は、生細胞数の測定結果に基づき、アミノ基量と細胞増殖能 (培養0日目に対する比率) との関係
- 20 をグラフ化したものであり、図9は、GAGの定量結果に基づき、アミノ基量とGAG産生能との関係をグラフ化したものである。これらの図から明らかなように、細胞増殖能についてはアミノ基量が高い方 ($65\sim90\ \mu\text{mol}/\text{g}$) が良好であったのに対して、GAG産生能についてはアミノ基量が低い方 ($75\ \mu\text{mol}/\text{g}$ 以下) が良好であった。ちな
- 25 なみに、アミノ基量と1細胞あたりのGAG産生量との関係をグラフ化したところ、図10に示すようにアミノ基量が高くなるに従い、1細胞

あたりのGAG産生量が低くなる傾向を示した。

以上の結果から、例えば、採取した細胞の量が多いときには、細胞増殖能は低くてよいがグリコサミノグリカンの産生能は高い方が好ましいことがあるため、これに見合ったアミノ基量、具体的には図8及び図9
5 からアミノ基量が $75\mu\text{mol/g}$ 以下、又はアミノ基の導入割合が $63\mu\text{mol/g}$ 以下を採用するようにしてもよい。また、採取した細胞の量が少ないときには、グリコサミノグリカンの産生能が低くても細胞増殖能は高い方が好ましいため、これに見合ったアミノ基量、具体的には図8及び図9からアミノ基量が $65\sim 90\mu\text{mol/g}$ 、又はアミノ
10 基の導入割合が $53\sim 78\mu\text{mol/g}$ を採用してもよい。

産業上の利用の可能性

本発明によれば、整形外科、口腔外科、形成外科などの医療分野に広く利用可能な組織再生用基材、移植用材料を提供することができる。

請求の範囲

1. 複数の環状分子を貫通させた線状分子の両末端に加水分解性結合を介して嵩高い置換基を有する生体親和性基が導入されたポリロタキサン、又は、このポリロタキサンにつき隣合うポリロタキサン 1 分子中に含まれる環状分子同士、生体親和性基同士もしくは環状分子と生体親和性基とを架橋結合で架橋して網目構造としたポリロタキサンヒドロゲルからなる組織再生用基材において、
- 前記複数の環状分子には細胞接着性を付与する修飾基を有するものがある、組織再生用基材。
- 10 2. 前記修飾基は、正に荷電する基である、請求項 1 に記載の組織再生用基材。
3. 前記修飾基は、窒素原子を含む基である、請求項 1 に記載の組織再生用基材。
4. 前記修飾基は、アミノ基である、請求項 1 に記載の組織再生用基材。
- 15 5. 前記アミノ基は、アミノ化剤としてジアミノアルカン類及びポリアミン類から選ばれた 1 種又は 2 種以上を用いて導入したものである、請求項 4 に記載の組織再生用基材。
6. 前記アミノ基は、アミノ化剤としてヒドラジン、1, 2-ジアミノエタン（エチレンジアミン）、1, 3-ジアミノプロパン、1, 4-ジアミノブタン、1, 5-ジアミノプロパン、1, 6-ジアミノヘキサン、
- 20 o-フェニレンジアミン、m-フェニレンジアミン及びp-フェニレンジアミンからなる群より選ばれた 1 種又は 2 種以上を用いて導入したものである、請求項 4 に記載の組織再生用基材。
7. 前記アミノ基は、アミノ化剤としてジアミノベンゼン類、ポリリジン、ポリビニルアミン及びキトサンからなる群より選ばれた 1 種又は 2
- 25 種以上を用いて導入したものである、請求項 4 に記載の組織再生用基材。

8. 前記ポリロタキサンヒドロゲルへの前記アミノ基の導入割合と、前記組織再生用基材を用いて所定の細胞を培養したときの細胞増殖状態又はグリコサミノグリカン産生状態との相関関係を予め求めておき、該相関関係に照らして所望の細胞増殖状態又は所望のグリコサミノグリカン
- 5 産生状態となるように前記アミノ基の導入割合が設定されている、請求項4～7のいずれかに記載の組織再生用基材。
9. 前記修飾基は、疎水性の基である、請求項1記載の組織再生用基材。
10. 前記修飾基は、アシル基、コレステロール、トリグリセリド、リン脂質、グリセロ糖脂質及びスフィンゴ糖脂質からなる群より選ばれた
- 10 1種又は2種以上である、請求項1記載の組織再生用基材。
11. 複数のシクロデキストリンを貫通させた線状分子の両末端に加水分解性結合を介して嵩高い置換基を有する生体親和性基が導入されたポリロタキサンとN, N'-カルボニルジイミダゾールとを反応させて得られた反応生成物に、ポリエチレングリコールビスアミンおよびアミノ
- 15 化剤を反応させることにより得られた組織再生用基材。
12. 複数のシクロデキストリンを貫通させた線状分子の両末端に加水分解性結合を介して嵩高い置換基を有する生体親和性基が導入されたポリロタキサンとN, N'-カルボニルジイミダゾールとを反応させて得られた反応生成物に、ポリエチレングリコールビスアミンおよびアシル
- 20 化剤を反応させることにより得られた組織再生用基材。
13. 組織再生用基材を製造する方法であって、
- 複数のシクロデキストリンを貫通させた線状分子の両末端に加水分解性結合を介して嵩高い置換基を有する生体親和性基が導入されたポリロタキサンとN, N'-カルボニルジイミダゾールとを反応させ、該反応
- 25 によって得られる反応生成物にポリエチレングリコールビスアミンおよびアミノ化剤を反応させることにより組織再生用基材を製造する方法。

14. 組織再生用基材を製造する方法であって、

複数のシクロデキストリンを貫通させた線状分子の両末端に加水分解性結合を介して嵩高い置換基を有する生体親和性基が導入されたポリロタキサンとN, N'-カルボニルジイミダゾールとを反応させ、該反応
5 によって得られる反応生成物にポリエチレングリコールビスアミンおよびアシル化剤を反応させることにより組織再生用基材を製造する方法。

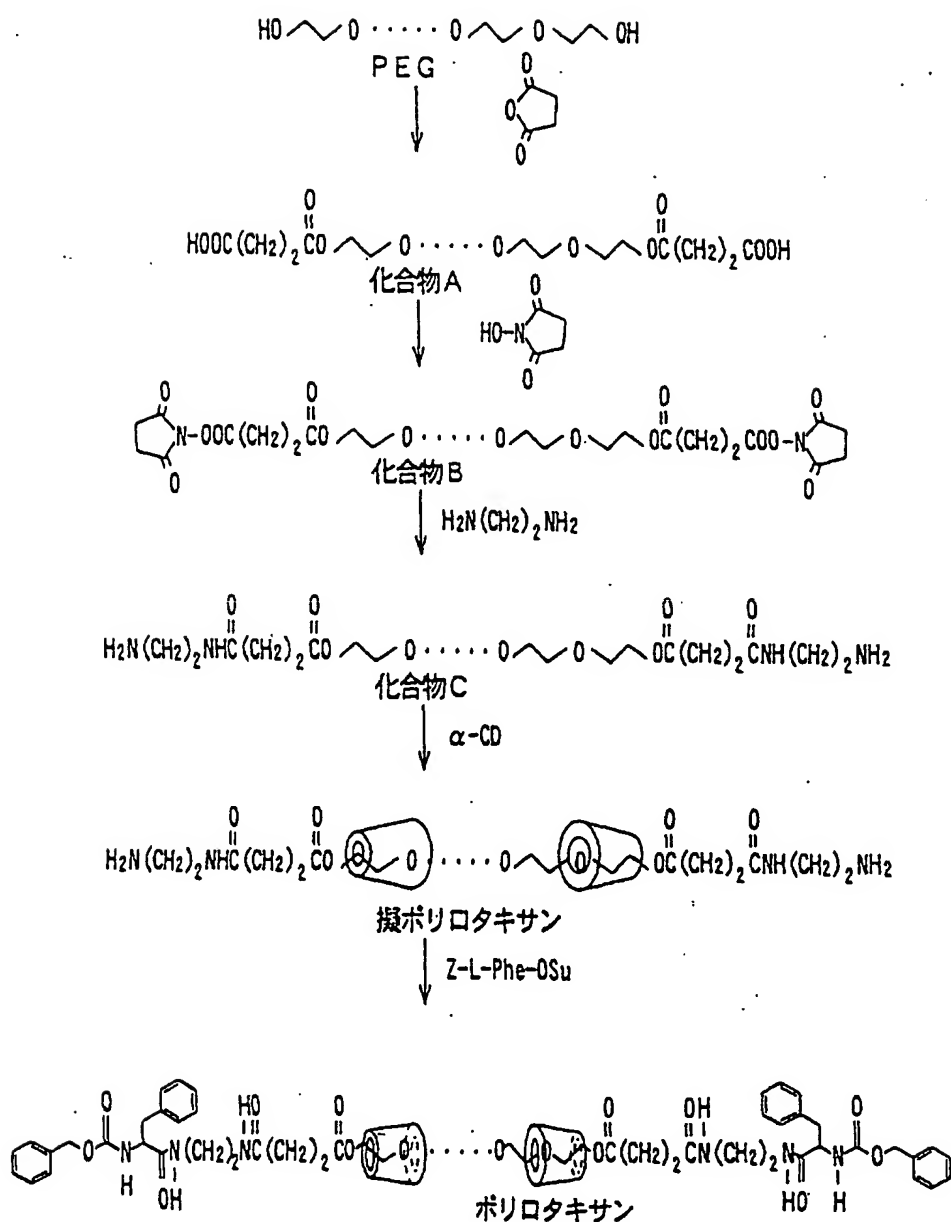
15. 請求項1～12のいずれかに記載の組織再生用基材に細胞が培養されているか又は組み込まれている移植用材料。

16. 請求項1～12のいずれかに記載の組織再生用基材又は請求項1
10 5に記載の組織再生用基材にグリコサミノグリカンが保持されている移植用材料。

17. 請求項1～12のいずれかに記載の組織再生用基材に細胞を培養するか又は組み込むことにより移植用材料を得る移植用材料の製法。

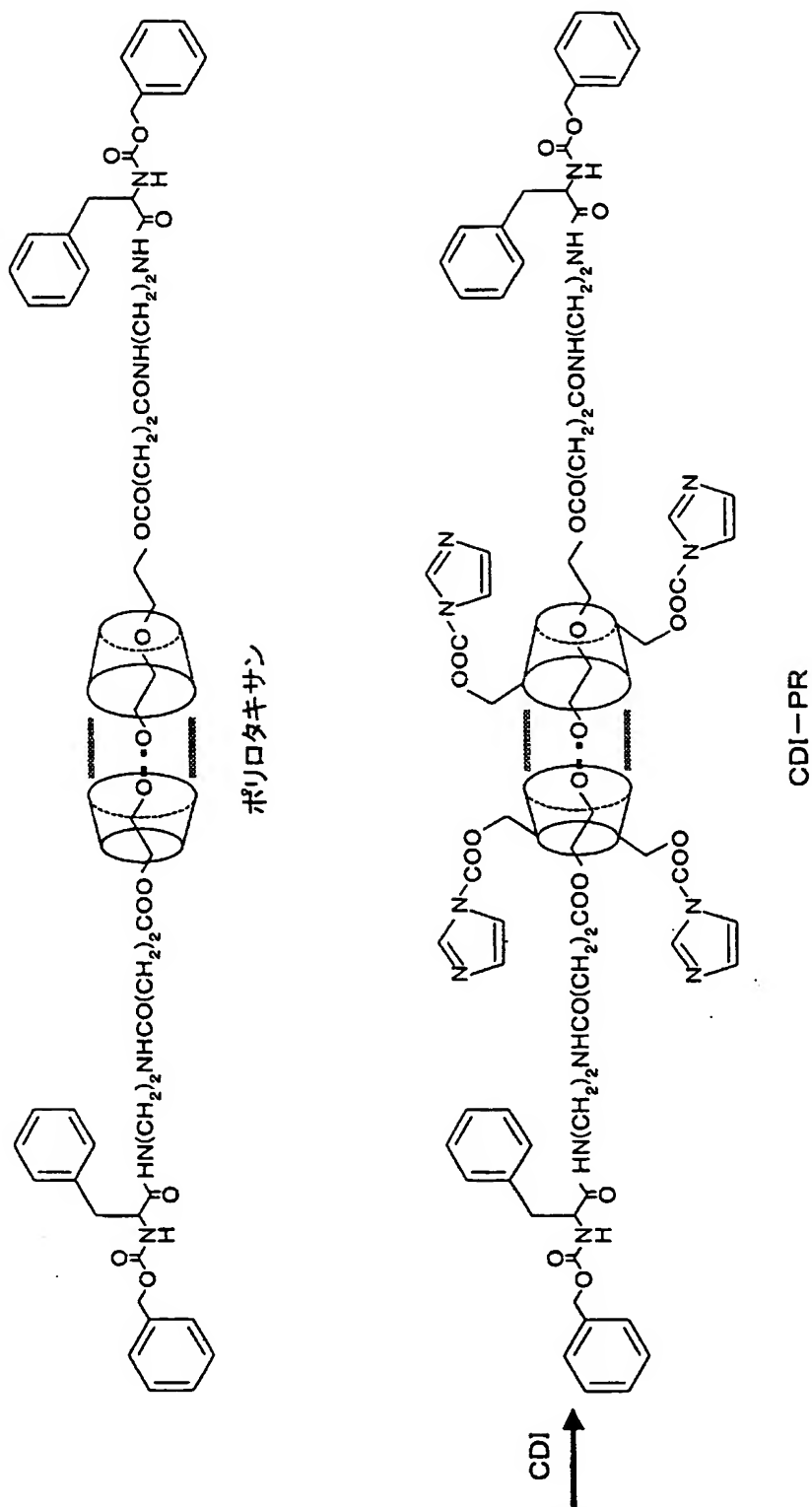
1/10

図 1



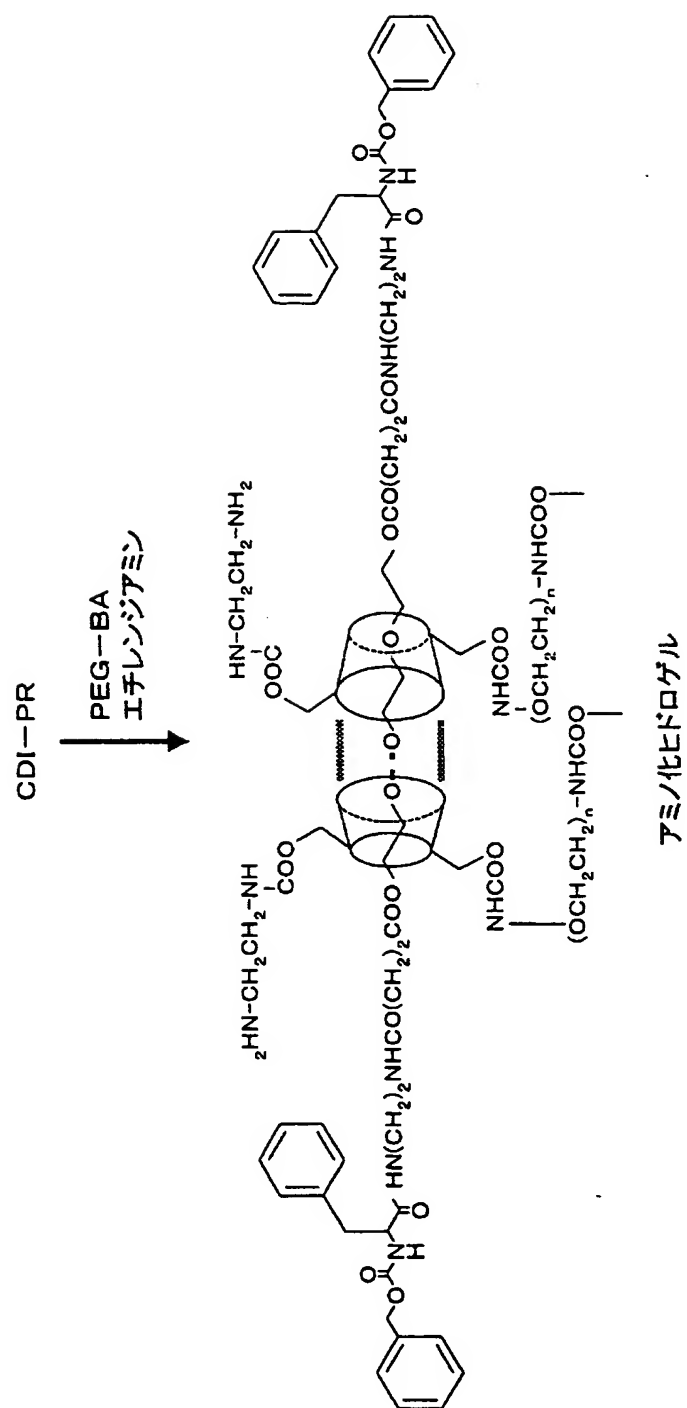
2/10

図 2



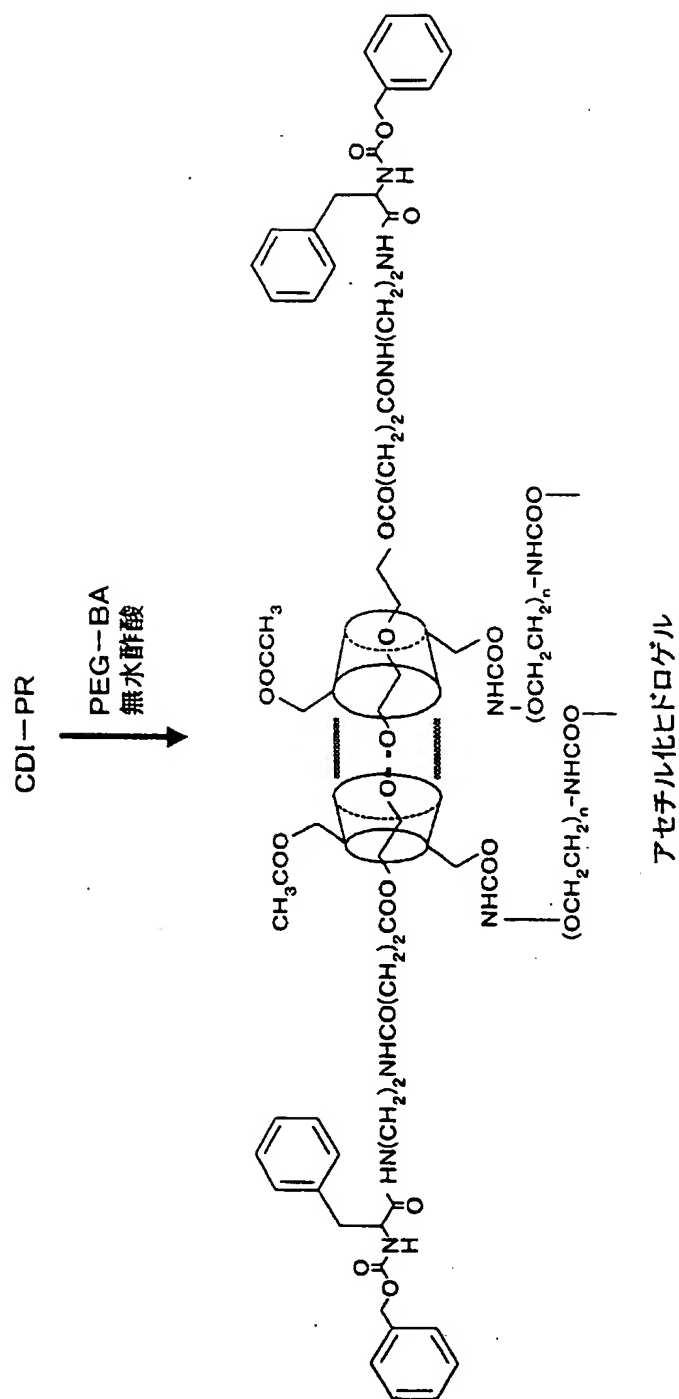
3/10

图 3



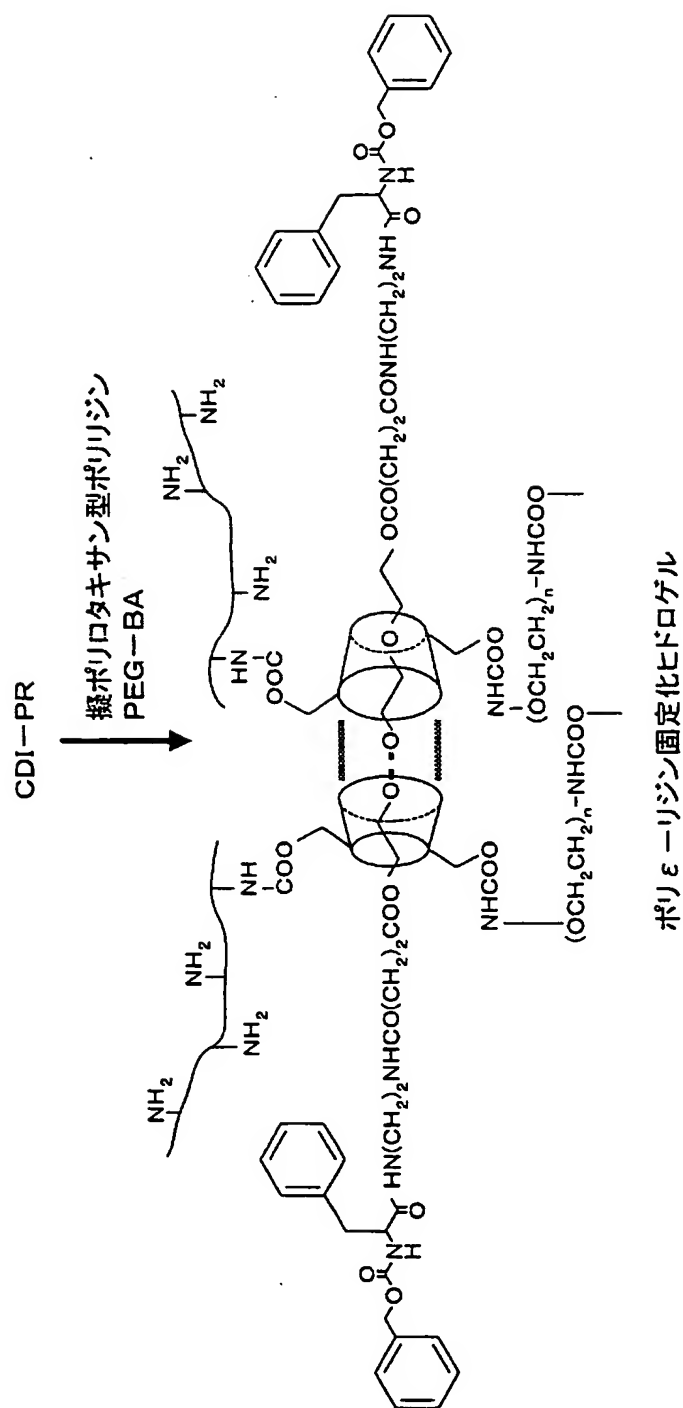
4/10

図 4



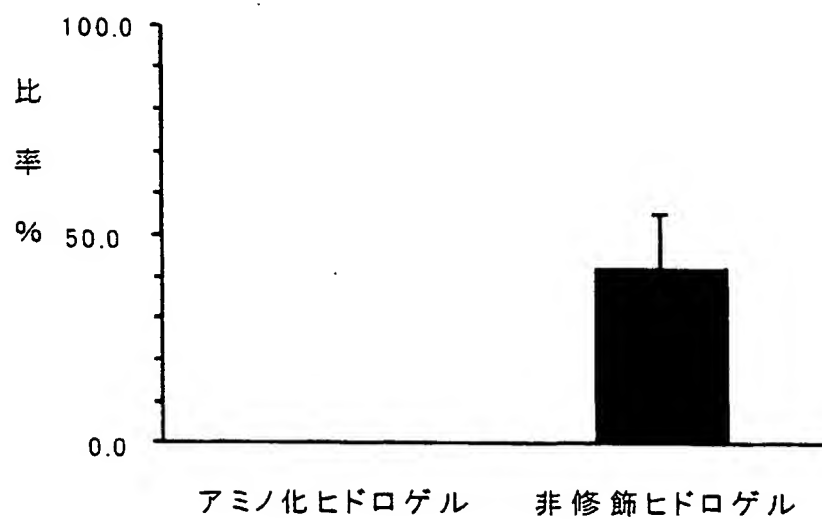
5/10

図 5



6/10

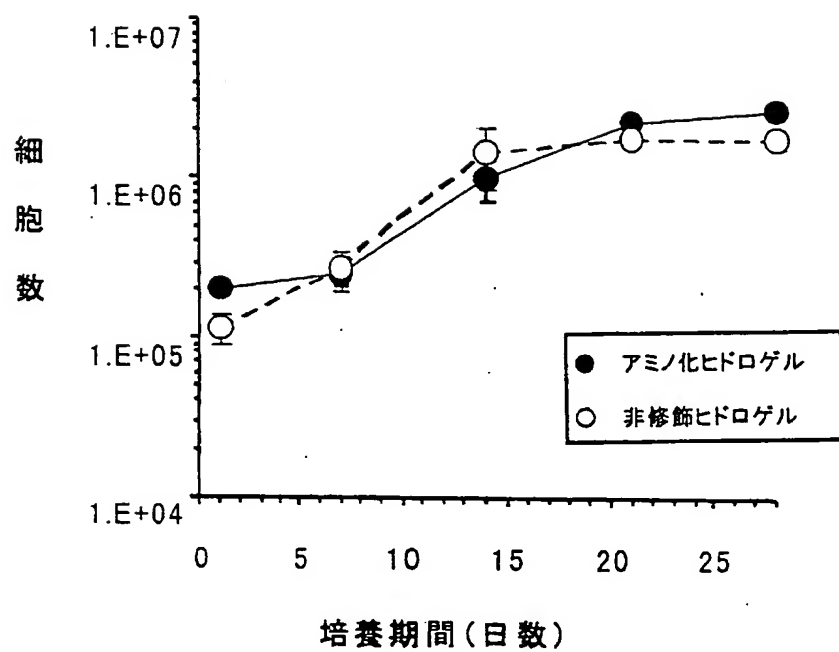
図6



※比率 = $100 \times (\text{零れ落ちた細胞数}) / (\text{播種細胞数})$

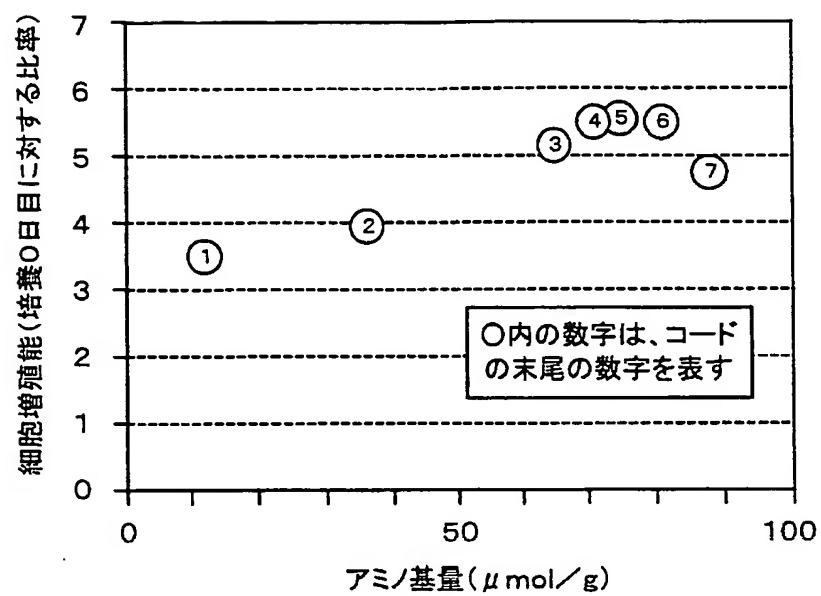
7/10

図7



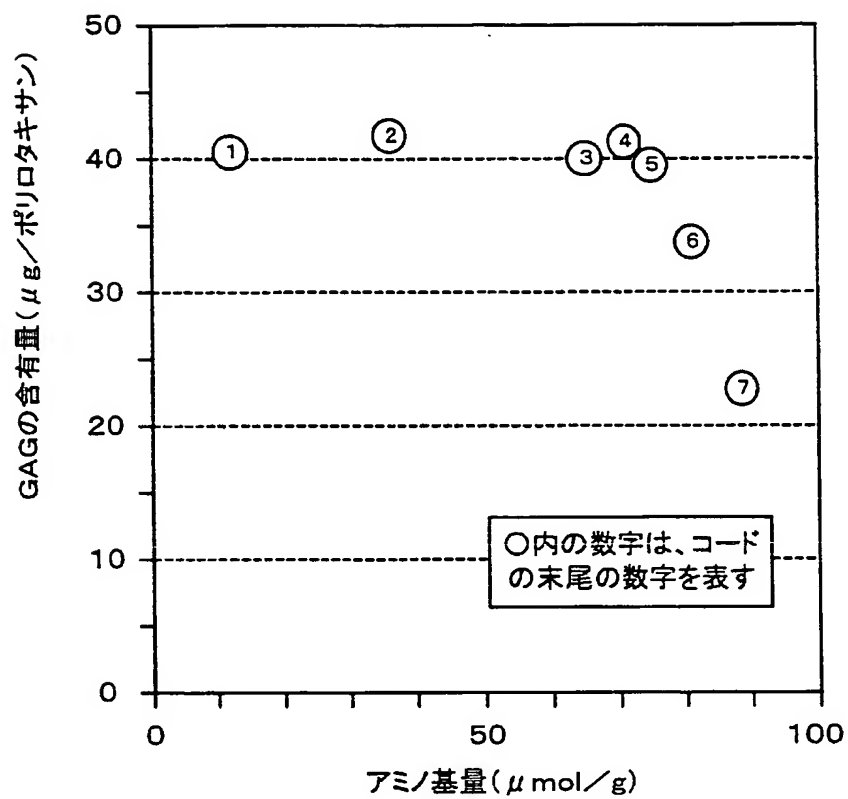
8/10

図8



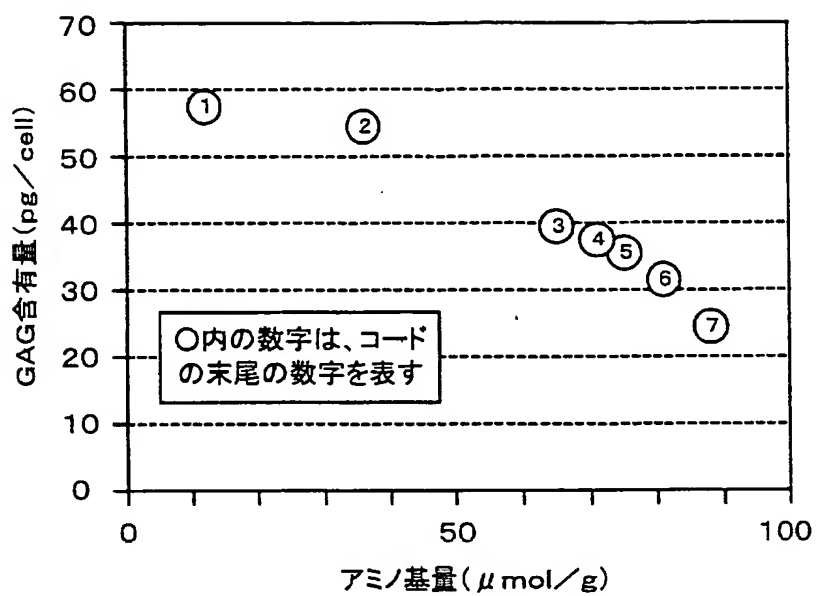
9/10

図9



10/10

図10



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02531

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61L27/18, 27/52, C12M3/00, C12N5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61L27/18, 27/52, C12M3/00, C12N5/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), JOIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	WO 02/02159 A (Kabushiki Kaisha Japan Tissue Engineering), 10 January, 2002 (10.01.02), Full text; particularly, description, page 8, line 25 to page 9, line 2 & AU 1552801 A	1-7, 9-17 8
Y A	WATANABE, J. et al., Feasibility study of hydrolyzable polyrotaxanes aiming at implantable materials, Journal of Artificial Organs, 2000, Vol.3, pages 136 to 142	1-7, 9-17 8
Y A	JP 11-319069 A (Japan Science and Technology Corp.), 24 November, 1999 (24.11.99), Full text (Family: none)	1-7, 9-10, 15-17 8, 11-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not

considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing
date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means

"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
03 June, 2003 (03.06.03)

Date of mailing of the international search report
17 June, 2003 (17.06.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02531

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 297605 A (MITSUBISHI KASEI CORP.), 04 January, 1989 (04.01.89), Claim 1; description, page 3, line 38 to page 4, line 7 & DE 3875396 A & JP 1-010979 A & US 5006467 A	1-7, 11, 13, 15-17
Y	WO 00/24437 A (ASHBY SCIENTIFIC LTD.), 04 May, 2000 (04.05.00), Claim 18; description, page 3, lines 15 to 20 & AU 6358999 A & CA 2348493 A & EP 1124592 A & JP 2002-52857 A	1-3, 15-17
Y	WATANABE J. et al., Effect of acetylation of biodegradable polyrotaxanes on its supramolecular dissociation via terminal ester hydrolysis, J.Biomater.Sci.Polymer Edn., 1999, Vol.10, No.12, pages 1275 to 1288 Full text	9-10, 12, 14-17
Y	JP 7-178 A (New Japan Chemical Co., Ltd.), 06 January, 1995 (06.01.95), Claims 1 to 2; description, Par. No. [0004] (Family: none)	1, 9-10, 12, 14-17
Y	JP 5-38278 A (Kao Corp.), 19 February, 1993 (19.02.93), Description, Par. No. [0007] (Family: none)	1, 9-10, 12, 14-17

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61L27/18, 27/52, C12M3/00, C12N5/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61L27/18, 27/52, C12M3/00, C12N5/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
Caplus (STN), MEDLINE (STN), JOIS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y A	WO 02/02159 A (ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング), 2002. 01. 10, 文献全体、特に明細書第8頁第25行-第9頁第2行参照 & AU 1552801 A	1-7, 9-17 8
Y A	WATANABE J. et al., Feasibility study of hydrolyzable polyrotaxanes aiming at implantable materials, Journal of Artificial Organs, 2000, vol. 3, pp. 136-142	1-7, 9-17 8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

03. 06. 03

国際調査報告の発送日

17.06.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

榎原 貴子

4C

9444

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y A	JP 11-319069 A (科学技術振興事業団), 1999. 11. 24, 文献全体 (ファミリーなし)	1-7, 9-10, 15- 17 8, 11-14
Y	EP 297605 A (MITSUBISHI KASEI CORPORATION), 1989. 01. 04, 請求の範囲 1, 明細書第3頁第38行—第4頁第7行 & DE 3875396 A & JP 1-010979 A & US 5006467 A	1-7, 11, 13, 15-17
Y	WO 00/24437 A (ASHBY SCIENTIFIC LTD.), 2000. 05. 04, 請求の範囲 18, 明細書第3頁第15—20行 & AU 6358999 A & CA 2348493 A & EP 1124592 A & JP 2002-528567 A	1-3, 15-17
Y	WATANABE J. et al., Effect of acetylation of biodegradable polyrotaxanes on its supramolecular dissociation via terminal ester hydrolysis, J. Biomater. Sci. Polymer Edn., 1999, vol.10, no.12, pp.1275-1288 文献全体	9-10, 12, 14- 17
Y	JP 7-178 A (新日本理化株式会社), 1995. 01. 06, 請求項 1-2, 明細書第0004段落 (ファミリーなし)	1, 9-10, 12, 14-17
Y	JP 5-38278 A (花王株式会社), 1993. 02. 19, 明細書第0007段落 (ファミリーなし)	1, 9-10, 12, 14-17